

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09509

研究課題名(和文) ヒト樹状細胞によるナイーブヘルパーT細胞の活性化・分化誘導機序の解明

研究課題名(英文) Proliferation and Differentiation of naive helper T cells by Dendritic cells in Human

研究代表者

永井 太郎 (NAGAI, Taro)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：60747674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Th1サイトカインであるIFN-gだけでなくTh2サイトカインであるIL-4やIL-13も、樹状細胞からのIL-12産生を増強する。IFN-gはDCからのIL-12産生もIL-23産生も増強する。一方、IL-4やIL-13はDCからのIL-12産生は増強するがIL-23産生は抑制する。IL-10はDCからのIL-12/23/27産生を抑制する。IL-10はIFN-g/IL-4/IL-13の樹状細胞サイトカイン産生増強作用を抑制する。未熟樹状細胞のサイトカイン産生能は成熟樹状細胞より劣るが、それでもT細胞分化増殖誘導には十分な量である。

研究成果の概要(英文)：Not only IFN-g which is Th1 cytokine but also IL-4 and IL-13 which are Th2 cytokine enhance the IL-12 production from a dendritic cell. IFN-g reinforces both the IL-12 production from DC and the IL-23 production. On the other hand, IL-4 and IL-13 reinforce the IL-12 production from DC, but the IL-23 production controls it. IL-10 controls IL-12/23/27 production from DC. IL-10 controls dendritic cell cytokine-producing reinforcement action of IFN-g/IL-4/IL-13. The cytokine-producing ability of the immature dendritic cell is inferior to a mature dendritic cell, but still is enough quantity for a T cell differentiation increase instruction.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 サイトカイン T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

樹状細胞(DC)はナイーブ Th 細胞を活性化し、Th1、Th2、Th17、制御性 T(Treg)細胞、濾胞 T(Tfh)細胞などの T 細胞亜集団への分化・成熟に非常に重要な役割を果たしている。しかし、**異なる DC 亜集団が異なる T 細胞亜集団へと活性化しているのか否かについてはいまだ明確な回答が得られていない**。DC 機能は、CD80/CD86 などの共刺激分子とサイトカインによって担われている。そこで、これまで主にマウスの系を用いて、種々のサイトカインや T 細胞抗原受容体刺激と共にナイーブ T 細胞を刺激し、T 細胞がどのように成熟し各 T 細胞亜集団に分化していくかという研究がなされてきた。例えば、IL-12 添加によって細胞性免疫に重要な Th1 細胞へと分化することが示されているが、この系では、IL-12 添加により Th1 細胞が活性化されると IFN- $\gamma$  が産生され、その IFN- $\gamma$  により、さらに DC が活性化されるという自己増幅系が作用している。同様に、IL-4 を添加すると液性免疫反応やアレルギー反応を誘導する Th2 細胞へ、IL-6/TGF- $\beta$  を添加すると自己免疫・炎症性 Th17 細胞へ、さらに免疫抑制性の細胞への分化誘導として、TGF- $\beta$  を添加すると induced Treg (iTreg)細胞へ、IL-27/ TGF- $\beta$  で IL-10 を産生する Treg (Tr1)細胞へ、IL-35 で induced Tr35 (iTr35)細胞へ、分化成熟することなどが報告されている。これらの系はサイトカインによる多クローン性細胞の活性化を検出しており、DC 依存的な T 細胞反応を必ずしも反映しているわけではない。

DC を標的とした抗原特異的な免疫制御法の開発には、DC が抗原特異的なナイーブ T 細胞にどのようにペプチド(抗原)を提示し、どのように活性化し、そして分化・成熟させるかを解析する系が必要となる。応募者らはこれまでに、ヒト CD14<sup>+</sup>DC 前駆細胞から成熟 DC への分化系を確立し、IFN- $\gamma$  / IL-12 がこの過程に影響を及ぼしていることを明らかにしてきた(van Seventer, Nagai et al. *J. Neuroimmunol.* 133, 60-71, 2002)。

例えば、DC へ IFN- $\gamma$  を添加するタイミングが早期や中期でも Th1 分化誘導能を増強するが、後期だと IFN- $\gamma$  のシグナル伝達を阻害し抑制される(図 1, Nagai et al. *J* 171, 5233-43, 2003)。これらの事実は、サイトカイン作用は時間的にも厳密に制御されており、おそらく複雑な階層性を持ったネットワークによって制御されているということを示唆している。

われわれは以前に、IL-12 他は DC 自身からの IFN- $\gamma$  産生も増強しナイーブ Th 細胞を Th1 細胞に分化増殖させ、IFN- $\gamma$  は DC からの IL-12 他の産生をさらに増強するという自己増幅系が重要なことを明らかにした(Nagai et al. *Scand. J. Immunol.* 65, 107-17, 2007)。しかし、その他の亜集団に関しては明確ではない。また、DC を IFN- $\gamma$  刺激する際、抑制性サイトカイン IL-10 を加えると IL-12 産生は低下したが、Th2 サイトカインである IL-4 または IL-13 を加えると IL-12 産生が意外にも増加することを見出した(2013 年度日本免疫学会)。

さらに、その時の IL-23 や IL-27 産生に関して調べてみても、IL-10 や IL-4 の効果はそれぞれのサイトカインでかなり異なることが示唆された。最近、ヒト単球から IL-4+GM-CSF で誘導された DC(DC1)は IL-12 を産生して Th1 亜集団を誘導するが、IL-4+IL-3 で誘導された DC(DC2)は IL-12 を産生せず Th2 亜集団を誘導するという報告(Hata et al. *Immuno. Lett.* 126, 29-36, 2009)がある。しかし、**応募者らが予備的検討したところ、両者からの IL-12 産生量は IFN- $\gamma$  存在下で増加するという結果だった、両者とも Th1 亜集団を誘導するに十分量だった(2014 年度日本免疫学会で発表)**。この結果は、“**DC をどのように誘導したかではなく、DC がどのように刺激されたか**”が重要で、これによって、その DC が誘導する Th 亜集団が決まることを示唆している。

抗原刺激 DC による抗原特異的な Th 細胞活性化や分化成熟の過程は、**抗原とサイトカイン**や Toll 様受容体(TLR)リガンドの刺激による DC

**の分化・成熟、成熟 DC による Th 細胞活性化、**  
さらに**活性化 T 細胞による DC 活性化増幅**の 3  
つのステップに分けて考えることができる。本研  
究では、ヒト DC およびナイーブ Th 細胞を分離し、  
マウスの系で提唱されているサイトカイン (IL-1、  
IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-17、IL-23、IL-27、  
IL-35、TGF- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$  など) を中  
心として、DC の成熟・分化および T 細胞亜集団  
への分化・成熟機序を検討していく。

## 2. 研究の目的

マウス樹状細胞 (DC) がどのように T 細胞を活  
性化するかについては、精力的に研究が行われ、  
今日おおよそその枠組みが提出されている。  
しかし、**ヒト DC の解析については、未知の部分  
が多い。**本研究では、応募者らのこれまでの研  
究を基に、**種々の刺激により成熟化したヒト DC  
を調製し、その DC を用いて抗原と共に CD4<sup>+</sup>ナ  
イーブヘルパー T (Th) 細胞を刺激すると、その  
T 細胞がどのように活性化され、どの T 細胞亜  
集団へと分化・成熟していくのかを明らかにする。**  
この基本的な仕組みを解明することにより、DC  
を調節することにより各 T 細胞亜集団への分化  
成熟を調節することができるようになる。**DC を標  
的とした種々の免疫疾患に対する新規治療法  
や、人為的に誘導した DC を用いた免疫細胞療  
法の開発が、加速すると期待できる。**

## 3. 研究の方法

本研究では、『ヒト DC には亜集団が存在し、そ  
の DC 亜集団ごとにナイーブヘルパー T 細胞を  
どの T 細胞亜集団に分化成熟させるのか決まっ  
ている。』という仮説の基に研究を推進する。『ど  
のような性状の活性化 DC が、どの T 細胞亜集  
団 (Th1、Th2、Th17、Treg、Tfh など) の分化・誘  
導に関わっているのか?』を明らかにする。最初  
に、(1) 様々な条件下でサイトカインによって誘  
導・活性化される DC の細胞表面マーカーおよ  
び産生されるサイトカインを明らかにする。次に、  
(2) これらの活性化 DC によって活性化されるナ  
イーブヘルパー T 細胞の Th 細胞亜集団への分  
化成熟を、サイトカイン産生および細胞表面マ  
ーカーによって明らかにする。さらに、(3) この活  
性化された Th 細胞亜集団による DC や B 細胞  
の活性化の効果も検討する。最後に、分化に関  
わっている転写因子活性化経路を siRNA や

CPISPR-Cas9 システムを用いて明らかにし、DC  
によるヒトナイーブ Th 細胞活性化・分化成熟機  
序を解明する。

## 4. 研究成果

- Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  だけでなく  
Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 も、DC  
からの IL-12 産生を増強する。
- IFN- $\gamma$  は DC からの IL-12 産生も IL-23 産  
生も増強する。一方、IL-4 や IL-13 は DC  
からの IL-12 産生は増強するが IL-23 産生  
は抑制する。
- IL-10 は DC からの IL-12/23/27 産生を抑制  
する。IL-10 は IFN- $\gamma$ /IL-4/IL-13 の DC  
サイトカイン産生増強作用を抑制する。
- imDC のサイトカイン産生能は mDC より劣る  
が、それでも T 細胞分化増殖誘導には十分  
な量である。
- IL-4 による DC からの IL-12 産生増強効果  
は IFN- $\gamma$  によるものよりも時間がかかる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に  
は下線)

(雑誌論文) (計 0 件)

(学会発表) (計 4 件)

Difference between Immature Dendritic  
Cells (imDCs) And Mature Dendritic Cells  
(mDCs) Derived from Human Monocytes,  
Taro Nagai (2017 年 6 月、日本樹状細胞研  
究会)

Difference between Immature Dendritic  
Cells (imDCs) and Mature Dendritic Cells  
(mDCs) Derived from Human Monocytes,  
Taro Nagai (2017 年 5 月、アメリカ免疫学会  
AAI)

Differences between Immature and Mature  
Dendritic Cells (imDC and mDC) Derived  
from Human Monocytes, Taro Nagai (2016  
年 12 月、日本免疫学会学術集会)

Not only IFN- $\gamma$  but also IL-4 or IL-13  
enhances IL-12p70 secretion from mature  
dendritic cells derived from human  
monocytes. Taro Nagai (2016 年 9 月、日本  
樹状細胞研究会)

(図書) (計 0 件)

(産業財産権)

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:

番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表

永井 太郎 (NAGAI, Taro)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 60747674

##### (2)研究分担者

善本 隆之 (YOSHIMOTO, Takayuki)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 80202426

秦 喜久美 (HATA, Kikumiata)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 30287156

##### (3)連携研究者( ) 研究者番号:

##### (4)研究協力者